

中国部分绵羊品种 *BMPR-IB* 基因 RFLP 多态性的研究

刘凤丽¹, 刘永斌^{1,2}, 王 峰^{1,2}, 王 瑞¹, 田春英², 刘美霞³, 魏建民¹, 荣威恒²

(1. 内蒙古农业大学 生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010030;
3. 内蒙古医学院第二附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要: 为了研究骨形态发生蛋白受体 (*BMPR-IB*) 基因对绵羊排卵控制的作用, 进一步寻找与多胎绵羊相关的遗传标记, 为中国地方绵羊品种繁殖性状的标记辅助选择提供一定的理论基础。以影响 Booroola Merino 高产性能的 *BM-PR-IB* 基因为候选基因, 采用 PCR-RFLP 方法分析内蒙古地方品种, 蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊与中国美利奴多胎品系共 206 只绵羊个体的基因多态性, 以及 *BMPR-IB* 基因多态性与绵羊进化的关系。结果表明: 高繁殖力的中国美利奴羊多胎品系 *BMPR-IB* 基因编码序列第 746 位碱基处发生了与 Booroola Merino 绵羊相同的突变 (A746G), 而低繁殖力的蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊则没有发生这种突变。

关键词: 绵羊; 基因多态性; 骨形态发生蛋白受体 *IB* 基因; PCR-RFLP

中图分类号: S826 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0151-04

Study on the Polymorphism of Bone Morphogenetic Protein Receptor *IB* in China Partial Sheep

LIU Feng-li¹, LIU Yong-bin^{1,2}, WANG Feng^{1,2}, WANG Rui¹, TINA Chun-ying²,
LIU Mei-xia³, WEI Jian-min¹, RONG Wei-heng²

(1. College of Biological Engineering, Inner Mongolian Agricultural University, Huhhot 010018,
China; 2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Husbandry Sciences, Huhhot 010010, China;
3. The Second Accessory Hospital, Academy of Inner Mongolia Medicine Science, Huhhot 010010, China)

Abstract: In order to study function of *BMPR-IB* on sheep ovulation control and to find the genetic marker of multi fetus sheep, bone morphogenetic protein receptor *IB* (*BMPR-IB*) gene which controlled fecundity of Booroola Merino ewes was studied as a candidate gene on the prolificacy in mongolian ewes and china Merino. Single nucleotide polymorphism of *BMPR-IB* gene was determined in high fecundity sheep breeds (china merino) and low fecundity sheep breeds (mongolian sheep, hulunbeier sheep, Inner mongolian fine wool sheep) by PCR-RFLP. The results indicated that there was a same mutation (A746G) of *BMPR-IB* gene in china Merino as that in Booroola Merino ewes. The mutation did not exist in mongolian sheep, hulunbeier sheep, Inner Mongolian fine woolsheep.

Key words: Sheep; Gene polymorphism; *BMPR-IB* gene; PCR-RFLP

绵羊的多胎性很早就引起国内外育种学家的关注, 世界许多绵羊品种存在多胎性, 如剑桥羊、芬兰羊、罗曼诺夫、湖羊和小尾寒羊等, 其中以澳洲的 Booroola Merino 羊的多胎机制了解的较为清楚。至今, 已从分子水平上找到了控制 Booroola Merino 羊排卵数的主效基因, 基本上阐明了 *FecB* 基因对产羔

数的作用机制。众多国内学者对湖羊和小尾寒羊 *BMPR-IB* 基因突变做了大量研究, 尽管湖羊和小尾寒羊起源于蒙古羊的说法被大多研究者所接受, 但有关蒙古羊是否带有 *BMPR-IB* 基因突变及对该品种产羔率的影响尚未见报道。本研究以高繁殖力绵羊品种 (中国美利奴羊多胎品系) 及内蒙古低繁殖力

收稿日期: 2007-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560102)

作者简介: 刘凤丽 (1978-), 女, 内蒙古人, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。
通讯作者: 刘永斌 (1977-), 男, 内蒙古人, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究工作。

绵羊品种(蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊)为试验材料。采用 RFLP 方法对 *BMPRII* 基因进行检测,以比较该基因在 4 个绵羊品种中的多态性,旨在寻找与产羔数相关的遗传标记,为选育内蒙古高繁殖力绵羊提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

中国美利奴羊多胎品系(科尔沁型)53 只成年母羊血样采自内蒙古自治区通辽市嘎达苏种羊场,蒙古羊 51 只成年母羊采自内蒙古自治区锡林郭勒盟黑城子示范牧场,呼伦贝尔羊 49 只成年母羊采自内蒙古自治区呼伦贝尔市种羊场、内蒙古细毛羊 53 只母羊血样采自内蒙古自治区锡林郭勒盟正蓝旗五一牧场。颈静脉采血,所采血样均为 10 mL/只,用 ACD 抗凝,− 20℃ 冻存。酚-氯仿抽提基因组 DNA,− 20℃ 保存备用。

1.2 试验试剂

蛋白酶 K, *Ava*II 限制性内切酶购于 TaKaRa 公司;PMD18-T Vector, DNA Ladder 2000(分子量为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp, Ex-Taq DNA 聚合酶、IPTG、X-gal 购自 TaKaRa 公司;凝胶 DNA 回收试剂盒、日常型质粒小量制备试剂盒购于杭州维特洁生化技术有限公司;琼脂粉、琼脂糖、氨苄青霉素(Amp⁺)、胰蛋白胨、酵母提取物、SDS 购于 Sigma 公司。

1.3 引物的设计和 PCR 扩增

绵羊骨形态发生蛋白受体 *IB* 基因位于 6 号染色体上,编码序列长 1 509 bp,可分成 10 个外显子,编码 502 个氨基酸^[1, 2],我们选择该基因在布鲁拉美利奴羊的突变位点 A746G 处设计 1 对特异引物,产物大小为 140 bp,引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列:

Forward: 5'-CTATGGGGAAGTTTGGATG-3'

Reverse: 5'-GTTTTCATGCCTCATCAACACGGTG-3'

PCR 扩增体系为 25 μL,其中:模板 DNA 50~100 ng, 10× Buffer 2 μL, dNTP 200 pmol/L, DNATaq 酶 1.0 U(大连宝生物),上下游引物各 20 pmol, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 加双蒸水至 25 μL。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 30 次; 72℃ 延伸 5 min。

1.4 RFLP 分析

PCR 产物用 *Ava* II 酶(大连宝生物)酶切,酶切体系:反应总体积为 20 μL,其中 PCR 产物 8 μL, *Ava* II 限制性内切酶为 2 U, 加双蒸水 10 μL, 37℃ 酶切过

夜。将酶切产物在 2.5% 琼脂糖凝胶中电泳检测,电泳结束后,对酶切电泳条带进行 RFLP 分析。

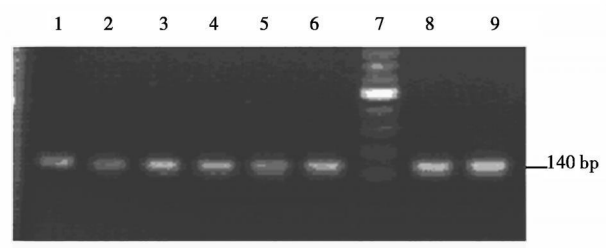
1.5 PCR 产物的克隆测序

经 RFLP 分析后,不同纯合基因型个体的 PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳并回收,回收后的 DNA 用 pMD18-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH5α 菌株测序,经 PCR 鉴定的重组子菌液寄到试剂公司进行测序,测序工作由大连宝生物技术有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

PCR 产物图 1 所示在 100 bp 和 200 bp 之间有 1 条特异性片段,与预期扩增片段大小一致,可以直接进行 RFLP 分析。



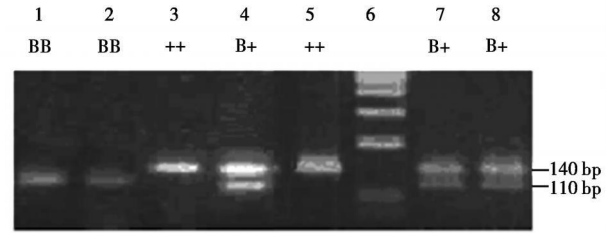
第 7 泳道为 100 bp marker; 其余泳道为 PCR 产物
Line 7 is marker; Lines 1- 6, 8- 9 are PCR products

图 1 绵羊 *BMPRII* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of sheep *BMPRII* gene

2.2 PCR-RFLP 电泳结果与分析

扩增的产物进行 RFLP 检测,在扩增的位点处发生了多态。该位点 746 处有 1 个单核苷酸由 A 变为 G, 因为该位点为 G 时,会产生限制性内切酶 *Ava*II 的酶切位点(GGACC)。该位点为 A 时(A-GACC),则不存在 *Ava*II 的酶切位点,酶切 PCR 产物只有 1 个片段(140 bp); 当该位点为 A/G 杂合时,酶切 PCR 产物后会产生 3 个片段(140, 110 和 30 bp)。



第 6 泳道为 marker; 其余泳道为酶切产物
Line 6 is marker; Lines 1- 5, 7- 10 are digestion product

图 2 绵羊 *BMPRII* 基因酶切结果

Fig. 2 PCR-RFLP pattern for *BMPRII* gene with *Ava*II Digestion

图 2 所示, PCR-RFLP 电泳结果,在所有供试的羊群中共产生 3 种基因型,其中,只有 110 bp 片段的

被命名为 *BB* 基因型; 只有 140 bp 片段的被命名为 ++ 基因型; 有 140 和 110 bp 2 个片段的被命名为 *B+* 基因型。

2.3 不同绵羊品种 *BMPR-IB* 基因型分布统计分析

表 1 结果表明, 在高繁殖力中国美利奴肉用多胎品系中

胎品系中有 3 种基因型, *BB* 基因型频率为 0.32, ++ 基因型频率为 0.19, *B+* 基因型频率为 0.49; 而低繁殖力蒙古羊, 呼伦贝尔羊, 内蒙古细毛羊全部为 ++ 基因型。研究结果提示: *BMPR-IB* 基因 Q249R 突变区 B 等位基因与绵羊繁殖力呈正相关。

表 1 *BMPR-IB* 基因在不同品种羊内的多态性分布
Tab.1 Polymorphism of *BMPR-IB* gene in different sheep breeds

品种 Breed	数量/ 只 N	检测基因型分布/ 只 Genotype assignment			基因频率/ % Gene frequency		基因型频率/ % Genotype frequency		
		++	B+	BB	+	B	++	BB	B+
CMMM	53	10	17	26	35	65	19	32	49
MG	51	51	0	0	100	0	100	0	0
HL	49	49	0	0	100	0	100	0	0
XM	53	53	0	0	100	0	100	0	0

注: CMMM 代表中国美利奴肉用多胎品系; MG 代表蒙古羊; HL 代表呼伦贝尔羊; XM 代表内蒙古细毛羊, 下同
Note: CMMM stand for china merino; MG stand for mongolian sheep; HL stand for hulunbeier sheep; XM stand for Inner mongolian fine wool sheep, the same below

2.4 不同绵羊品种 *BMPR-IB* 基因型分布差异检验

对 *BMPR-IB* 基因型在 4 个绵羊品种中分布差异作卡方检验分析, 结果见表 2。中国美利奴肉用多胎品系与蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊的基因型分布存在极显著性差异($P < 0.01$); 蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊 3 个品种之间差异不显著($P > 0.05$)。证明 *BMPR-IB* 基因型在不同绵羊品种分布差异与品种繁殖力高低显著相关。

列中只存在一个突变位点, 即编码区第 746 位由 A 突变为 G, 这个突变使 ++ 基因型氨基酸序列上相应的谷氨酰胺变成了 BB 基因型的精氨酸(Q249R) (图 3) 所示。

表 2 不同绵羊品种 *BMPR-IB* 基因型分布差异检验

Tab.2 Test of difference for *BMPR-IB* genotype distribution in four sheep breeds

品种	HL	MG	XM
CMMM	68.6**	70.5**	72.36**
HL		0	0
MG			0

注: $df = 2$, $\chi^2_{0.05} = 5.99$, $\chi^2_{0.01} = 9.21$

2.5 *BMPR-IB* 基因 Q249R 突变区的纯合子个体的克隆测序

对纯合子个体克隆测序结果表明, 该段 DNA 序

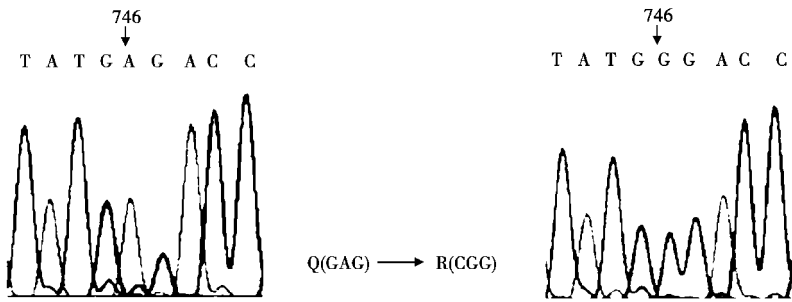


图 3 *BMPR-IB* 基因的突变位点
Fig.3 *BMPR-IB* gene mutation

3 讨论

3.1 *BMPR-IB* 基因型在高、低繁殖性能羊群中的分布

Mulsant 等^[1]鉴别出 *BMPR-IB* 基因编码序列一个突变(Q249R), 发现这个突变与 *FecB* 等位基因完全相关。Wilson 等^[3]通过对不同羊群的 *BMPR-IB* 基因 A476G 突变位点进行检测, 结果只在含有澳大利亚美利奴 Booroola 品系血统的羊群中检测到该突变位点, 而在与美利奴 Booroola 品系无关的羊群中

未检测到该突变位点。Davis 等^[4]对 8 个国家(新西兰、印度尼西亚、波兰、冰岛、法国、爱尔兰共和国、菲律宾和印度) 高繁殖力绵羊品种进行了 *BMPR-IB* 突变(Q249R) 检测。在印度的 Garole 绵羊和印度尼西亚的 Javanese 绵羊中发现了 *FecB* 突变, 但在与 Merino、Garole 和 Javanese 绵羊没有亲缘相关的 6 个品种中则没有发现 *FecB* 突变。本研究以中国美利奴多胎品系、蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊为试验材料进行 *BMPR-IB* 基因多态性分析, 结果表明: 高繁殖力的中国美利奴羊多胎品系 *BMPR-IB* 基因编

码序列第746位碱基处发生了与 *Booroola Merino* 绵羊相同的突变(A746G),而低繁殖力的蒙古羊、呼伦贝尔羊、内蒙古细毛羊则没有发生这种突变。说明 *BMPR-IB* 基因在一些高繁殖力绵羊中存在多态性,而在低繁殖力绵羊中可能没有多态性,群体遗传学分析表明 *BMPR-IB* 基因型分布在高、低繁殖性能的羊群中有明显差异。

3.2 *BMPR-IB* 基因突变与绵羊进化关系

在 Garole 绵羊中发现 *FecB* 突变^[4] 为支持 *Booroola* 基因是 18 世纪晚期通过 Garole (Bengal) 绵羊被引入澳大利亚羊群这一历史记录提供了强烈的证据。Wilson 等^[3] 对 *Booroola* 表型已被导入绵羊品种的沙特阿拉伯、荷兰和美国 80 只绵羊进行了检测,发现突变在羊群中出现了分离,表明 Q249R 突变在起源于 *Booroola* 美利奴的绵羊中分离。王根林^[5]、柳淑芳^[6]、王启贵^[7] 等研究证实,湖羊和小尾寒羊都携带 *FecB* 基因突变。可以推断湖羊和小尾寒羊应当有较近的亲缘关系,但湖羊仅为 BB 纯合型,而小尾寒羊则有 BB、B+ 和 ++ 基因型,因此在一定程度上表明湖羊和小尾寒羊又有较远的亲缘关系,这与很多关于湖羊、小尾寒羊的研究结果相一致。耿荣庆等^[8] 对湖羊及国内外其他绵羊品种进行系统聚类分析,结果表明,湖羊与蒙古羊亲缘关系最近。巩元芳等^[9] 采用随机扩增多态 DNA 技术 (RAPD) 对湖羊和小尾寒羊等国内 7 个品种进行聚类关系研究,发现湖羊与蒙古羊首先聚在一起,滩羊和小尾寒羊聚为一类,而后聚为一类,这一结果表明湖羊和小尾寒羊都起源于蒙古羊,但小尾寒羊较湖羊和蒙古羊的关系较远。尽管湖羊、小尾寒羊起源于蒙古羊的说法被大多研究者所接受,但有关蒙古羊是否带有 *BMPR-IB* 基因突变及对该品种产羔率的影响尚未见报道。本研究采用 RFLP 方法对蒙古羊 *BMPR-IB* 基因突变作检测,没有发现突变位点。这暗示湖羊、小尾寒羊尽管起源于蒙古羊,但随着历史变迁在不同区域的自然条件下形成了独特的多胎品种。迄今为止,小尾寒羊、湖羊在产羔性能方面与

蒙古羊形成的显著差异,其分子生物学机制尚不清楚,因此找到控制小尾寒羊、湖羊、蒙古羊产羔相关的基因十分迫切。

参考文献:

- [1] Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, *et al.* Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(9): 5104- 5109.
- [2] Souza C J, MacDougall C, Campbell B K, *et al.* The Booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (*BMPRI B*) gene [J]. *J Endocrinol*, 2001, 169(2): 1- 6.
- [3] Wilson T, Wu X Y, Juengel J L, *et al.* Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (*ALK-6*) that is expressed in both oocytes and granulose cells [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64: 1225- 1235.
- [4] Davis G H, Galloway S M, Ross I K, *et al.* DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (*FecB*) mutation [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1869- 1874.
- [5] 王根林, 毛鑫智, Davis G H, 等. DNA 分析发现我国湖羊和小尾寒羊存在 Booroola (*FecB*) 多胎基因 [J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(1): 104- 106.
- [6] 柳淑芳, 姜运良, 杜立新. *BMPR-IB* 和 *BMP15* 基因作为小尾寒羊多胎性能候选基因的研究 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(8): 755- 760.
- [7] 王启贵, 钟发刚, 李 辉, 等. 羊 *BMPR-IB* 基因多态性与其产羔数的相关研究 [J]. *草食家畜*, 2003, 2: 20- 23.
- [8] 耿荣庆, 常 洪, 杨章平, 等. 湖羊起源及系统地位的研究 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2002, 30(3): 21- 28.
- [9] 巩元芳, 李祥龙, 刘铮铸, 等. 我国主要地方绵羊品种随机扩增多态 DNA 研究 [J]. *遗传*, 2002, 24(4): 423- 426.
- [10] 刘永斌, 王 峰, 荣威恒, 等. 骨形态发生蛋白的研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2005(4): 35- 37.
- [11] 王 峰, 刘永斌, 荣威恒, 等. 牛 *BMP4* 基因部分 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2005(5): 25- 27.